



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 28 204.0

**Anmeldetag:** 09. Juni 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis Pharma Deutschland GmbH,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Auffindung von medizinisch  
wertvollen Wirkstoffen

**IPC:** A 61 K 31/452

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 08. Februar 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

JOOST

## Verfahren zur Auffindung von medizinisch wertvollen Wirkstoffen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von neuartig und vorteilhaft wirkenden, medizinisch wertvollen Substanzen die Inhibitor eines Proteins sind.

Enzyme sind hochmolekulare Proteine, die in allen Zellen vorkommen. Als

- 10 Biokatalysatoren ermöglichen sie den Ablauf der zahlreichen biochemischen Stoffwechselwege des Lebens. Dabei sind sie jeweils für ganz bestimmte Reaktionen spezifisch. Sie treten mit Substraten in Wechselwirkung; als Zwischenstufe bildet sich ein Enzym/Substrat, und schließlich wird nach chemischer Umwandlung das gebildete Produkt in das Medium abgegeben.

15

Einfache Enzyme tragen nur eine Bindungsstelle für die Aufnahme des Substrates.

Komplexere Systeme bestehen aus mehreren kovalent oder nicht-kovalent verbundenen Enzymdomänen mit den Bindungsstellen A, B, C, D usw., die häufig jeweils einer Enzymdomäne zugeordnet werden. Diese Bindungsstellen erkennen wiederum im

- 20 Substrat eine oder mehrere strukturelle bzw. chemisch funktionelle Gruppen Z, die gleich (Z1, Z2, Z3 usw.) oder verschieden sein können, d.h. Y, X, W usw..

Entsprechende komplexere Enzymreaktionen sind aus mehreren Teilreaktionen zusammengesetzt. So kann die Domäne A mit der Substratgruppe Z1 in

- 25 Wechselwirkung treten. Die Domäne B kann ebenfalls mit Z1 reagieren, oder mit Z2, oder mit einer oder mehreren Stellen Y, X usw.

Eine katalytische Domäne ist eine Aminosäuresequenz eines Proteins oder Enzyms, die ein Substrat bindet und chemisch umwandelt. Eine Bindungsdomäne ist eine

- 30 Aminosäuresequenz eines Proteins oder Enzyms, die ein Substrat reversibel bindet.

Wenn man Inhibitoren für komplexe Proteine sucht, werden in der Regel Inhibitoren für die katalytische Domäne gefunden, weil diese Inhibitoren eine Verringerung der

- 35 chemischen Umsetzung des Substrates bewirken. Diese können auch durch die

fehlenden oder verringerten Umsetzungen des Markersubstrats angezeigt werden. Wesentlich schwieriger ist es, Inhibitoren für die Bindungsdomäne zu finden.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher Stoffe zu finden, die die Bindung von Substraten an die Bindungsdomäne eines Proteins, verringern oder im wesentlichen verhindern.

10 Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass ein Protein, das Markersubstrat und das Substrat mit einem Stoff inkubiert werden und festgestellt wird, ob das Markersubstrat vom Protein umgesetzt wird.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Stoff ein Inhibitor eines Proteins ist, wobei man

- 15 a) ein Protein einsetzt, welches mindestens eine katalytische Domäne enthält und mindestens eine Bindungsdomäne enthält,
- b) mindestens ein Markersubstrat einsetzt, welches an die katalytische Domäne bindet und umgesetzt wird,
- 20 c) mindestens ein Substrat einsetzt, welches an die katalytische Domäne und an die Bindungsdomäne binden kann,
- d) das genannte Protein, das Markersubstrat und das Substrat mit dem Stoff inkubiert und
- 25 e) bestimmt, ob das Markersubstrat vom Protein umgesetzt wird.

30 Geeignete Proteine sind beispielsweise Enzyme, die mindestens eine katalytische Domäne und mindestens eine Bindungsdomäne enthalten. Die Enzyme können aber auch 1 bis 8 katalytische Domänen und 1 bis 8 Bindungsdomänen enthalten, bevorzugt sind jeweils 1, 2, 3 und 4 katalytische Domänen bzw Bindungsdomänen. Das Substrat sind Verbindungen, die sowohl an die Bindungsdomäne als auch an die katalytische Domäne binden können und wobei das Substrat von der katalytischen Domäne

35 chemisch umgesetzt wird und von der Bindungsdomäne chemisch nicht verändert wird. Das Markersubstrat ist eine vom Substrat chemisch unterschiedliche Verbindung, die

von der katalytischen Domäne chemisch umgesetzt wird und es erlaubt die Umsetzungsreaktion zu verfolgen.

Der Stoff bindet im wesentlichen reversibel oder irreversibel mit der Bindungsdomäne des Proteins und verhindert dadurch die Bindung des Substrats an das Protein. Der Stoff kann daher als Inhibitor der Bindungsdomäne des Proteins angesehen werden.

Der Stoff verhindert im wesentlichen nicht die chemische Umwandlung des Markersubstrats durch die katalytische Domäne des Proteins.

- 10 Ein Beispiel für ein geeignetes Protein ist das Enzym Kollagenase, das aus mindestens zwei kovalent verbundenen Enzymdomänen besteht, einer Kollagen bindenden, sowie einer weiteren mit proteolytischen Fähigkeiten, die den Kollagenstrang durchschneidet. Diese katalytische proteolytische Domäne, sei es nun im kovalenten Verbund des Enzyms mit voller Länge, d.h. des natürlich vorkommenden aktiven Enzyms, oder nur  
15 die rekombinant hergestellte proteolytische Domäne, besitzt die Fähigkeit, auch verschiedenartige Markersubstrate zu spalten.

- Geeignete Markersubstrate für die Kollagenase sind beispielsweise Peptide, die mit Fluoreszenz- oder UV-Markern versehen sind. Beispiele für Markersubstrate für  
20 derartige Enzyme sind 7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-di-aminopropionyl)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, (Knight, C.G., et al, FEBS Letters (1992) 296, 263-266), Dnp-Pro-β-cyclohexyl-Ala-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH<sub>2</sub> (Bickett D. M., et al., Analytical Biochemistry (1993) 212, 58-64); Mca-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub> (Knäuper V., et al., JBC (1996) 271/3, 1544-1550); Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys-Dnp-NH<sub>2</sub> (Nagase H., et al., JBC (1994) 269/33,  
25 20952-20957); Dnp-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-NH<sub>2</sub> (Niedzwiecki L., et al., Biochemistry (1992) 31, 12618-12623) (Bickett D. M., et al., Analytical Biochemistry (1993) 212, 58-64; Knight, C.G., et al, FEBS Letters (1992) 296, 263-266; Knäuper V., et al., JBC (1996) 271/3, 1544-1550; Nagase H., et al., JBC (1994) 269/33, 20952-20957;  
30 Niedzwiecki L., et al., Biochemistry (1992) 31, 12618-12623 oder radioaktiv markierte Peptide.

- Ein geeignetes Substrat für die Kollagenase ist Kollagen. Kollagen ist ein prolinreicher Gerüsteiweißkörper (Kleroproteine) der gegen enzymatische Angriffe schützende  
35 Hauptbestandteil mesenchymaler interzellulärer Stützsubstanzen ist. Drei Eiweißketten mit linksläufiger Helixstruktur sind zu einer rechtsdrehenden Tripelhelix (Superhelix)

verdrillt. Identifiziert sind 18 Kollagen-Typen (Kollagen-Typ I bis Typ XVIII), die nach Struktur bzw. Funktion in fibrilläre, Fibrillen-assoziierte und nichtfibrilläre Kollagene eingeteilt werden.

5. Besonders geeignet ist Kollagen vom Typ II als Substrat.

Dieses Kollagen stützt die Knorpelmatrix in Gelenken. In gewissen Krankheiten wie Osteoarthritis und Rheuma findet eine Zerstörung des Gelenkes statt, besonders bedingt durch den proteolytischen Abbau von Kollagen durch die Enzyme Kollagenasen.

Inhibitoren derartiger Enzyme sind bekannt, haben aber den Nachteil, daß sie an der

10 katalytischen Domäne des Enzyms angreift (Weithmann K. U., et al., Inflamm. res. (1997) 46, 246-252). Diese katalytischen Domäne ist in ähnlicher Struktur vielen Enzymen zu eigen, demzufolge wirken die Inhibitoren in unerwünschter Weise auf viele Enzyme, auch solche mit vitaler Funktion ein (Massova I., et al., The FASEB Journal

15 (1998) 12, 1075-1095). Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es der Medizin bessere Inhibitoren mit höherer Spezifität auf die jeweiligen Enzyme zur Verfügung zu stellen.

Inkubiert man Markersubstrat, Kollagen Typ II mit dem Enzym Kollagenase und bestimmt den Umsatz des Markersubstrats, so stellt man überraschenderweise fest, dass der Umsatz des Markersubstrats stark inhibiert wird. Diese Inhibition kann nur  
20 durch hohe Mengen vom Markersubstrat überwunden werden. Diese Hemmung des Umsatzes des Markersubstrats tritt jedoch nicht auf, wenn nur die katalytische Domäne von der Kollagenase mit Kollagen II und Markersubstrat inkubiert werden.

25 Überraschenderweise können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Stoffe identifiziert werden, die die Hemmung der Umsetzung vom Markersubstrat im wesentlichen aufheben, wenn die vollständige Kollagenase mit Markersubstrat, Kollagen Typ II und dem Stoff inkubiert werden. Dieser Effekt tritt nicht auf, wenn statt der vollständigen Kollagenase nur die katalytische Domäne der Kollagenase eingesetzt wird.

30 Enzyminhibitoren gemäß Stand der Technik (Weithmann K. U., et al., Inflamm. res. (1997) 46, 246-252) bewirken demgegenüber eine verstärkte Hemmung der Umsetzung von Markersubstrat, sowohl katalysiert durch das vollständige Enzym als auch durch die katalytische Domäne.

35 Beispiele für den Begriff „Protein, welches mindestens eine Bindungsdomäne und mindestens eine katalytische Domäne enthält“ sind beispielsweise die Mitglieder der

Matrixine, die Enzyme Gelatinase, Kollagenase-1, Neutrophilen-Kollagenase oder Matrix-Metalloproteinase Typ 13 (Massova I., et al., The FASEB Journal (1998) 12, 1075-1095).

- 5 Das Auffinden eines erfindungsgemäßen Stoffes wird dadurch angezeigt, dass im erfindungsgemäßen Verfahren, das Markersubstrat mit höherer Umsatzrate vom Protein umgesetzt wird. Im Gegensatz zu Inhibitoren gemäß Stand der Technik inhibieren die erfindungsgemäßen Stoffe nicht die enzymatische Domäne, sondern sie interferieren mit der Bindung des Substrates an die Bindungsdomäne(n) des Enzyms. Die
- 10 erfindungsgemäßen Stoffe bewirken eine Inhibierung mit verbesserter Spezifität, da sie nicht an der Enzymdomäne, die in vielen Enzymtypen vorkommt, angreifen.

In einem bevorzugten Verfahren werden als Protein Kollagenase, als Substrat Kollagen Typ II und (7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-di-aminopropionyl)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> als Markersubstrat eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Testkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, der aus den Bestandteilen

- 20 A) ein Protein, welches mindestens eine katalytische Domäne und mindestens eine Bindungsdomäne hat,
- B) ein Markersubstrat, welches von der an die katalytischen Domäne umgesetzt wird, und
- C) ein Substrat, welches an die katalytische Domäne und an die Bindungsdomäne binden kann, enthält.

25 In dem Bestreben, wirksame Verbindungen zur Behandlung von Bindegewebs-erkrankungen zu finden, wurde nun gefunden, daß der durch das erfindungsgemäße Verfahren aufgefundene Stoff 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin ein starker Inhibitor der Metalloproteinasen ist. Dabei wird auf die

30 Hemmung von Stromelysin (Matrix Metalloproteinase 3), der Neutrophilen Kollagenase (MMP-8) und der Aggrecanase besonderer Wert gelegt, da diese Enzyme beim Abbau der Proteoglykane, als wichtige Bestandteile des Knorpelgewebes, maßgeblich beteiligt sind (A. J. Fosang et al. J. Clin. Invest. 98 (1996) 2292-2299).

35 Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin und/oder

eines physiologisch verträglichen Salzes von 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin und/oder eine stereoisomere Form von 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin, zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften eignet sich die erfindungsgemäße Verbindungen 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin zur Prophylaxe und Therapie all solcher Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von Matrix-abbauenden Enzymen wie Kollagenasen, Metalloproteinasen oder Aggrecanase, beteiligt ist. Dazu gehören degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen.

Ferner gehören dazu auch Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen, Periodontalerkrankungen, Wundheilungsstörungen und chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels. Ferner eignen sich 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin zur Behandlung der Ulceration, Atherosklerose und Stenosen. Weiterhin eignen sich 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin zur Behandlung von Entzündungen, Krebserkrankungen, Tumormetastasenbildung, Kachexie, Anorexie und septischem Schock.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel wird im allgemeinen oral oder parenteral verabreicht. Die rektale oder transdermale Applikation ist auch möglich.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet, daß man 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

Geeignete feste oder galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten (Mikro)Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe,

Süßungsmittel und Lösungsvermittler Verwendung finden. Als häufig verwendete Hilfsstoffe seien Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Cellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuß- oder Sesamöl, Polyethylen- glykol und Lösungsmittel wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole wie Glycerin, genannt.

- Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis der erfindungsgemäßen Verbindung 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin enthält. Bei festen Dosierungseinheiten wie Tabletten, Kapseln, Dragees oder Suppositorien, kann diese Dosis bis zu etwa 1000 mg, bevorzugt jedoch etwa 50 bis 300 mg und bei Injektionslösungen in Ampullenform bis zu etwa 300 mg, vorzugsweise aber etwa 10 bis 100 mg, betragen. Für die Behandlung eines erwachsenen, etwa 70 kg schweren Patienten sind Tagesdosen von etwa 20 mg bis 1000 mg Wirkstoff, bevorzugt etwa 100 mg bis 500 mg indiziert. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehrerer kleinerer Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Inhibitor, dadurch erhältlich, dass er durch das erfindungsgemäße Verfahren aufgefunden wird.

## Beispiele

Herstellung der BESTANDTEILE:

BESTANDTEIL A)

Enzym-Lösung:

MMP-13 wird als Handelsprodukt (Kat.Nr. HM 13210010) von Invitek GmbH, Berlin, Deutschland erhalten, nach Herstelleranweisung aktiviert, und mit TCB-Puffer auf 10µg/10ml aufgefüllt. TCB-Puffer wird hergestellt, indem 10 mM Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) in Wasser gelöst und mit HCl auf einen pH von 7,5 eingestellt werden. Zu dieser Lösung werden



100 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 0,05 % Brij 35-Lösung, 30 % (w/v) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) zugefügt.

#### 5 BESTANDTEIL b)

##### Markersubstrat-Lösung

Eine Lösung von 10 mmol/L (7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg- $\text{NH}_3$  (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland) in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Riedel-de Haen AG, Seelze, 10 Deutschland). wird mit Wasser 1 : 40 (v/v) verdünnt.

#### BESTANDTEIL C)

##### Kollagen II-Lösung

15 10 mg humanes Kollagen II (Fa. Biocon, Potsdam, Deutschland) werden in 2400  $\mu\text{l}$  10mmol/L Essigsäure gelöst (72 Stunden bei 4° C) und dann tropfenweise mit 1300 $\mu\text{l}$  einer Natriumhydrogencarbonatlösung (250 mmol/L)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

#### BESTANDTEIL D)

20 Erfindungsgemäßer Inhibitor, vorzugsweise gelöst in Wasser.

#### Untersuchungsprotokoll

25 Die Bestandteile 25 $\mu\text{l}$  von A), 5 $\mu\text{l}$  von B), 10 $\mu\text{l}$  von C) und 10 $\mu\text{l}$  von D) werden im Gesamtvolumen von 50 $\mu\text{l}$  gemischt, und die Fluoreszenz in einem handelsüblichen Spektrofluorimeter nach 15 Minuten gemessen (Anregung bei 330nm, Emission bei 390 nm, Spectrafluor plus, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)).

30 Enzym und Inhibitor werden für 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von 5  $\mu\text{l}$  Markersubstrat-Lösung BESTANDTEIL B) (25  $\mu\text{M}$ ) gestartet.

35 Die Fluoreszenz im Beispiel 1A wurde auf 100% gesetzt, und die Meßwerte der weiteren Beispiele auf diesen Wert bezogen.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

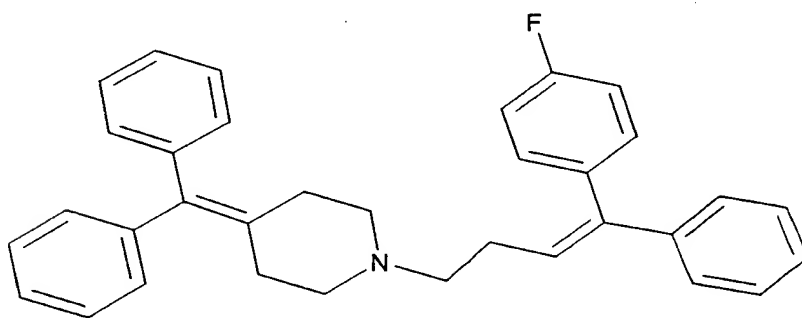
	Beispiel 1	Beispiel 2	Beispiel 3	Beispiel 4
Bestandteil A	ja	ja	ja	ja
Bestandteil B	ja	ja	ja	ja
Bestandteil C	nein	ja	ja	ja
Bestandteil D	nein	nein	200µmol/L Stoff (I)	200µmol/L Doxycyclin
Meßwert	100%	49%	59%	0%

- 5 Beispiel 3 entspricht dem erfindungsgemäßen Verfahren, welches das Auffinden von neuartigen Inhibitoren ermöglicht. Diese sind dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Konzentration bis 500 µmol/L, vorzugsweise 50 µmol/L oder kleiner, insbesondere auch schon ab 1 nmol/L, im Ausnahmefall bis 0,1 nmol/L, den Fluoreszenzwert von 50-99% ergeben.

10

Beispiel 4:

200µmol/L des erfindungsgemäßen Stoffes (I) 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin



(I)

15

ergeben den Wert 59%.

Beispiel 5

- 20 Davon abzugrenzen sind solche Stoffe, die Meßwerte von 49% und kleiner, bis auf Null absinkend ergeben. Entsprechend dem Stand der Technik ergeben 200µmol/L Doxycyclin (Weithmann K. U., et al., Inflamm. res. **(1997)** 46, 246-252) den Wert 0.

1. Verfahren zur Bestimmung, ob ein Stoff ein Inhibitor eines Proteins ist, wobei man

5

a) ein Protein einsetzt, welches mindestens eine katalytische Domäne enthält und mindestens eine Bindungsdomäne enthält,

10

b) mindestens ein Markersubstrat einsetzt, welches an die katalytische Domäne bindet und umgesetzt wird,

c) mindestens ein Substrat einsetzt, welches an die katalytische Domäne und an die Bindungsdomäne binden kann,

15

d) das genannte Protein, das Markersubstrat und das Substrat mit dem Stoff inkubiert und

e) bestimmt, ob das Markersubstrat vom Protein umgesetzt wird.

20

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Protein Kollagenase, als Substrat Kollagen und (7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> als Markersubstrat eingesetzt werden.

25

3. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 2, der enthält:

a) ein Protein, welches mindestens eine katalytische Domäne und mindestens eine Bindungsdomäne hat,

30

b) ein Markersubstrat, welches an die katalytische Domäne bindet und umgesetzt wird und

c) ein Substrat, welches an die katalytische Domäne und an die Bindungsdomäne binden kann.

35

4. 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin.

5. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin gemäß Anspruch 4 zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

6. Verwendung von 4-(Diphenylmethylen)-1-[4-(p-fluorphenyl)-4-phenyl-3-butenyl] piperidin gemäß Anspruch 4, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie all solcher Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von Matrix-abbauenden Enzymen wie Kollagenasen, Metalloproteinasen oder Aggrecanase, beteiligt ist, wie degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen. oder Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen, Periodontalerkrankungen, Wundheilungsstörungen und chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels oder Behandlung der Ulceration, Atherosklerose und Stenosen oder Behandlung von Entzündungen, Krebserkrankungen, Tumormetastasenbildung, Kachexie, Anorexie und septischem Schock.

7. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, dass er durch das Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2 bestimmt wird.

Verfahren zur Auffindung von medizinisch wertvollen Wirkstoffen

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von Inhibitoren für

Bindungsdomänen, worin man ein Protein einsetzt, welches mindestens eine katalytische Domäne enthält und mindestens eine Bindungsdomäne enthält, mit einem Markersubstrat, welches an die katalytische Domäne des Proteins bindet und umgesetzt wird, einem Substrat, welches an die katalytische Domäne und an die Bindungsdomäne reversibel binden kann, und dem Inhibitor inkubiert und bestimmt, ob das Markensubstrat vom Protein umgesetzt wird.

10

15